



Bescheinigung

Die GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Neuherberg in Oberschleißheim/Deutschland hat eine Patent-
anmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Ex Vivo-Immunisierung mittels
heterologer intakter bispezifischer und/oder
trispezifischer Antikörper"

am 17. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol
A 61 K 39/00 der Internationalen Patentklassifikation erhal-
ten.

München, den 19. Mai 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Aktenzeichen: 197 25 586.8

Agurks

REINHARD·SKUHRA·WEISE & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. ERNST STURM (1951-1980)
DR. HORST REINHARD
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DR. STEPHAN BARTH
FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN
POSTF. / P.O. BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN
* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P9435
Dr.B/Go

17. Juni 1997

Anmelder: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Neuherberg
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

VERFAHREN ZUR EX VIVO-IMMUNISIERUNG MITTELS HETEROLOGER INTAK- TER BISPEZIFISCHER UND/ODER TRISPEZIFISCHER ANTIKÖRPER

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur ex vivo-Immunisierung mittels heterologer, intakter bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper sowie Verwendungen dieses Verfahrens zur Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Induktion einer Tumormunität.

Maligne Erkrankungen des Menschen, beispielsweise Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium, haben trotz der Fortschritte der Chemo- und Radiotherapie in den letzten Jahren noch immer eine äußerst ungünstige Prognose. Eine Heilung dieser Erkrankungen ist in der Regel nicht möglich. Es ist daher notwendig, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Große Hoffnungen werden dabei auf immuntherapeutische Ansätze gesetzt, mittels derer

das Immunsystem des Patienten dazu gebracht werden soll, den Tumor abzustößen. Es ist bekannt, daß auf Tumorzellen tumorassoziierte Antigene vorkommen und daß das Immunsystem prinzipiell durchaus in der Lage ist, diese zu erkennen und die malignen Zellen anzugreifen. Tumoren haben jedoch verschiedene Strategien entwickelt, die es ihnen erlauben, sich der Immunantwort zu entziehen. Dies gelingt ihnen z.B. durch ungenügende Präsentation von tumorassoziierten Antigenen und/oder durch unzureichende Aktivierung der in der Regel vorhandenen tumorspezifischen T-Zellen.

Bei etwa 43.000 Neuerkrankungen / Jahr steht Brustkrebs an der Spitze der Krebsstatistik für Frauen in Deutschland. Weniger als ein Drittel der Frauen mit Lymphknotenbefall bei Diagnose leben 10 Jahre ohne Rückfall.

Immuntherapeutische Ansätze beim Mamma-Karzinom beschränkten sich bisher auf Methoden zur unspezifischen Stimulation wie die Behandlung mit BCG oder Levamisol, sowie den Einsatz von LAK- und NK-Zellen mit IL-2 (3, 4). Eine Lebensverlängerung konnte mit bisher eingesetzten Formen von Immuntherapie nicht nachgewiesen werden, die Behandlung mit BCG war sogar eher nachteilig (3). Nachdem unspezifische Aktivierungen von Zellen auch bei anderen Tumorarten wenig Erfolg gehabt haben, sollte nun versucht werden, eine spezifische Immunreaktion in Gang zu bringen.

Für die Tumorthherapie wurden beispielsweise T-Zell-redirectierende bispezifische Antikörper verwendet. Diese binden mit einem Bindungsarm an einen T-Zell-Rezeptorkomplex und mit dem zweiten Bindungsarm an ein tumorassoziiertes Antigen auf einer Tumorzelle. Durch die daraus resultierende Aktivierung der T-Zelle und der räumlichen Nähe der Tumorzelle wird letztere durch Apoptose-Induktion bzw. Zytokine wie TNF- α oder Perforin zerstört.

Die im Stand der Technik zur Tumorthherapie verwendeten bispezi-

fischen Antikörper wurden direkt in die Patienten infundiert. Diese Vorgehensweise weist mehrere Nachteile auf:

- Es sind hohe Antikörper-Dosen notwendig;
- es können gravierende Nebenwirkungen auftreten;
- durch den Tumorbindingssarm können die Antikörper bei in vivo-Applikation auch an Normalgewebe binden.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Verfahren bereitzustellen, um maligne Erkrankungen des Menschen, insbesondere mit dem Ziel einer Tumormunität, zu therapieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das im Anspruch 1 näher gekennzeichnete Verfahren gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen des Verfahrens ergeben sich auch aus den Unteransprüchen.

Weitere Ansprüche betreffen die Verwendung des erfindungsgemäß bereitgestellten Verfahrens zur Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Erreichung einer Tumormunität, besonders bevorzugt einer Langzeit-Immunität.

Erfindungsgemäß werden heterologe intakte bispezifische und/oder trispezifische Antikörper verwendet. Diese werden ex vivo mit zuvor aus einem Patienten entnommenen Tumorzellen (autologe Tumorzellen) in Kontakt gebracht. Um ein Überleben der Tumorzellen nach Reinfusion zu verhindern, wurden die Tumorzellen vor dem Inkontaktbringen mit den Antikörpern in an sich bekannter Weise behandelt, beispielsweise durch Bestrahlung. Die Tumorzellen werden nach Bestrahlung mit den intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern inkubiert. Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen einen funktionellen Fc-Teil besitzen, und sie müssen heterologer Natur sein, d.h. die Antikörper sind dann aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Fragmente) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

Diese intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie weiterhin die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- α - Binden an eine T-Zelle;
- β - Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ - Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen;
- δ - Aktivieren die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulato-
rischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

Bei den trispezifischen Antikörpern erfolgt die Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen bevorzugt beispielsweise über den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen oder auch über andere Antigene auf Fc-Rezeptor positiven Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen), wie z.B. den Mannose-Rezeptor.

Nur durch das erfindungsgemäße Verfahren und den Einsatz der hier beschriebenen Antikörper ist gewährleistet, daß nach Reinfusion der Antikörper in den Patienten, aus dem die Tumorzellen zuvor entnommen wurden, eine Tumormunität aufgebaut wird. Die Reinfusion erfolgt bevorzugt in einen Patienten nach der Behandlung des Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Bei Patienten mit wenig verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch sein kann, wird das erfindungsgemäß bereitgestellte Verfahren besonders erfolgreich anwendbar sein.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die aus dem Stand der Technik bekannten und oben näher beschriebenen Nachteile vermieden werden.

Die erfindungsgemäß verwendbaren heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper sind zum Teil an sich bekannt, zum Teil werden sie aber auch in der vorstehenden Anmeldung zum ersten Mal beschrieben. Ein Beispiel für einen bsAk ist der Antikörper anti-CD3 X anti-epcam, der bei epithelialen Tumoren wie dem Mammacarcinom eingesetzt wird.

Erfindungsgemäß werden zwei Verfahrens-Varianten unterschieden:

1. Kurzzeitinkubation, und
2. Langzeitinkubation

Bei der Kurzzeitinkubation werden die autologen Tumorzellen mit den intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern für einen Zeitraum von 10 Minuten bis 5 Stunden oder 10 Minuten bis 3 Stunden oder weiterhin bevorzugt für einen Zeitraum von ca. 15 Minuten bis 2 Stunden, weiterhin bevorzugt für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 1 Stunde, inkubiert. Die dann mit den Antikörpern beladenen Tumorzellen werden dann zur Reinfusion vorbereitet.

Bei der Langzeitinkubation werden die autologen Tumorzellen ebenfalls für einen Zeitraum von ca. 10 Minuten bis 5 Stunden, bevorzugt für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 2 Stunden und weiterhin bevorzugt für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 1 Stunde, inkubiert, so daß die autologen Tumorzellen mit den Antikörpern beladen werden. Anschließend werden hierzu Blutzellen des Patienten, bevorzugt mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC = peripheral blood mononucleated cells), zugegeben, und diese Mischung wird dann über einen längeren Zeitraum, beispielsweise 1 bis 14 Tage lang, bevorzugt 3 bis 10 Tage und weiterhin bevorzugt 6 bis 10 Tage, inkubiert. Alternativ hierzu können in einer weiteren Verfahrensführung die autologen Tumorzellen unmittelbar mit den bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern und mit den Blutzellen des Patienten, bevorzugt den mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, in Kontakt gebracht werden. Hierdurch wird eine Vielzahl von Immun-

zellen bereits ex vivo gegen den Tumor "geprimt". Anschließend werden diese in den Patienten reinfundiert. Durch die Langzeitinkubation wird auch eine Internalisierung der Antikörper und ihr Abbau erreicht.

Erste in vitro-Ergebnisse zeigen, daß durch derartig vorbehandelte Immunzellen Tumorzellen ohne weitere Zugabe von bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern zerstört werden können (vgl. Beispiel 1).

Sowohl bei der Kurzzeitinkubation als auch bei der Langzeitinkubation werden T-Zellen an die Tumorzellen mittels der an den Tumorzellen immobilisierten intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper redirigiert; gleichzeitig findet eine Bindung von Fc-Rezeptor positiven Zellen an den Fc-Teil des bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpers nach Reinfusion statt. Dabei werden die Fc-Rezeptor positiven Zellen durch Bindung an die Fc-Teile von (an der T-Zelle bzw. Tumorzelle) immobilisierten intakten bispezifischen Antikörpern aktiviert.

Zur Verbesserung des Immunisierungserfolges können die entweder nach dem Kurzzeit-Inkubationsverfahren oder nach dem Langzeit-Inkubationsverfahren mit den Antikörpern behandelten Tumorzellen nicht nur einmal an den Patienten appliziert, sondern wahlweise auch mehrfach verabreicht werden.

Auf der Tumorzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- γ und TNF- α) in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörpervermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt (siehe Abb. 1 und 3). D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Tumorzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Tumormunität erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1), können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2).

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der, an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle, an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung (Abb. 1A). Tumor-spezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach der erfindungsgemäßen ex vivo-Vorbehandlung ebenfalls reaktiviert werden (Abb. 1B).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Tumormunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Tumorebestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und NK-"Natural Killer"-Zellen). Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl tumorspezifische CD4- wie auch CD8-positive Zellen generiert werden. Tumorspezifische CD4-Zellen spielen darüberhinaus eine wichtige Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort im Zusammenhang mit der T-B-Zell Kooperation.

Bispezifische und trispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Zytokinen oder Apoptose-vermittelnde Mechanismen die Tumorzellen zerstören. Darüber hinaus besteht offenbar die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird (Abb. 1B). Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt und diese veranlaßt selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben (Abb. 1). Auf diese Weise kann offensichtlich eine T-Zellantwort u.U. auch gegen bislang unbekannte, tumorspezifische Peptide induziert werden.

Durch Redirektion von u.U. anergisierten, tumorspezifischen T-Zellen an Tumorzellen mittels bispezifischer und/oder trispezifischer bei gleichzeitiger Kostimulation derartiger T-Zellen durch akzessorische Zellen welche an den Fc-Teil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers binden, könnte die Anergie von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) aufgehoben werden. D.h. eine im Patienten gegen den Tumor existierende T-Zell-Toleranz kann mittels intakter heterologer bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper gebrochen und damit eine dauerhafte Tumorummunität induziert werden.

Für den letzten Punkt gibt es erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumorummunität nach Behandlung mit einem syngenem Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumoringektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumoringektion 144 Tage nach der ersten Tumoringektion - ohne eine erneute Gabe von

bsAk (siehe Beispiel 2).

Weitere Vorteile bei der ex vivo-Immunisierung mittels bispezifischer und/oder trispezifischer Antikörper sind (i) die Minimierung von möglichen Nebenwirkungen (ii) die kontrollierte Bindung des Tumorbindungsarms an die Tumorzelle außerhalb des Körpers und (iii) ein möglichst geringer Verbrauch von bispezifischen und trispezifischen Antikörpern. Dabei sind grundsätzlich zwei Vorgehensweisen möglich, die unten im einzelnen erläutert werden. Ein wichtiger Aspekt bei der Langzeitinkubation ist, daß der eingesetzte bispezifische oder trispezifische Antikörper innerhalb der projektierten Inkubationszeit verbraucht und abgebaut wird. Damit würde für eine derartige Immunisierung die langwierige Arzneimittelanmeldung entfallen.

Die Tumorzellen werden mit den Antikörpern beim Kurzzeit- und beim Langzeit-Inkubationsverfahren über einen Zeitraum von 10 Minuten bis 5 Stunden, bevorzugt bis 3 Stunden, weiterhin bevorzugt bis 2 Stunden und noch weiter bevorzugt 15 Minuten bis 1 Stunde lang inkubiert. Die Inkubation erfolgt bevorzugt bei einer Temperatur von 4°C bis 25°C, insbesondere bevorzugt bei 4°C bis 10°C. Die Inkubation wird bevorzugt in steriler Umgebung in gepufferter Kochsalzlösung bei einem neutralen pH-Wert durchgeführt. Bei der Kurzzeit-Inkubation erfolgt anschließend unmittelbar die Reinfusion in den Patienten. Beim Langzeit-Inkubationsverfahren werden nach dieser Vorinkubation die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut zugegeben und zusammen mit den bereits vorinkubierten Tumorzellen/Antikörpern für einen weiteren Zeitraum von 1 bis 14 Tagen, bevorzugter 3 bis 10 Tagen, weiterhin bevorzugt 6 bis 10 Tagen, inkubiert. Diese Inkubation erfolgt bevorzugt bei 37°C unter sterilen Bedingungen und unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Production = GMP) in einem Brutschrank. Wie weiter oben bereits beschrieben, können bei der Langzeit-Inkubation die Blutzellen auch zusammen mit den Tumorzellen und den Antikörpern unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden.

Die obengenannten Inkubationsbedingungen sind nur beispielhaft zu verstehen. In Abhängigkeit von den Tumorzellen und den verwendeten Antikörpern können auch andere Zeiträume, Temperaturbedingungen etc., allgemein andere Inkubationsbedingungen, gewählt werden. Der Fachmann kann durch einfache Versuche diese Bedingungen festlegen.

Bei der Vorinkubation werden die Tumorzellen bevorzugt in einer Menge von 10^7 bis 10^9 Zellen, weiterhin bevorzugt in einer Menge von ca. 10^8 Zellen, verwendet. Die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut werden in einer Menge von ca. 10^8 bis 10^{10} Zellen zugegeben. Selbstverständlich ist es für den Fachmann auch möglich, andere Inkubationsbedingungen zu wählen, die durch Laborversuche ermittelt werden können (bspw. Änderungen in der Zellzahl und Inkubationsdauer).

Die eingesetzten autologen Tumorzellen werden, um nach Reinfusion ein weiteres Überleben der Tumorzellen zu verhindern, bspw. bestrahlt. Beispielsweise werden γ -Strahlen verwendet, die bspw. in einer Dosisstärke von 50 bis 100 Gy eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fc γ -Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß einsetzbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fc γ -Rezeptor 1 positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als ko-stimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Zytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 und/oder TNF- α .

Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper weisen zumindest eine T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und einen an Fc-Rezeptor positive Zellen bindenden

Bindungsarm auf. Dieser zuletzt genannte Bindungsarm kann ein anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm oder ein Mannose-Rezeptor-Bindungsarm sein.

Der bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein heterologer intakter Ratte/Maus bispezifischer Antikörper.

Mit den erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörpern werden T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert. Bevorzugt einsetzbare heterologe intakte bispezifische Antikörper werden aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotyp-Kombinationen ausgewählt:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-
Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-
IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-
IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Hu-
man- IgG3*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3,
orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-

IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*-[CH3]

Bei den erfindungsgemäß verwendbaren Antikörpern handelt es

sich vorzugsweise um monoklonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte intakte Antikörper mit beispielsweise Fv-, Fab-, scFv- oder F(ab)₂-Fragmenten.

Bevorzugt werden Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z.B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörpertypen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig. Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z.B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege, haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z.B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z.B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zelllinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Das der Erfindung zugrunde liegende Problem kann sowohl durch bispezifische als auch trispezifische Antikörper gelöst werden, sofern sie die im Anspruch 1 gekennzeichneten Eigenschaften und Wirkungen aufweisen. Nachfolgend wird die Herstellung von Antikörpern mit Zwei- und Dreispezifitäten näher beschrieben. Die Bereitstellung derartiger bispezifischer und trispezifischer Antikörper gehört zum Stand der Technik, und auf die derartige Herstellungstechniken beschreibende Literatur wird hier voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, durch die das der Erfindung zugrundeliegende Problem ebenfalls lösbar ist, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z.B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv), angekoppelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

-S-S(G₄S)_nD-I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin).

Analog dazu können trispezifische F(ab)₂-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH₂-CH₃-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH₂-CH₃-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z.B. mittels homologer Rekombination, entfernt werden (siehe Abb.5).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (Abb.6).

Erfindungsgemäß werden z.B. intakte bispezifische Antikörper

verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halbmolekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, und besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift, auch bzgl. einer Definition der bispezifischen Antikörper, wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der obigen Definition führen.

Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (6) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z.B. c-erb-B2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkant bleiben.

Es wurde auch versucht, durch Behandlung mit bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten mit den Spezifitäten anti-c-erb-B2 x antiCD64 eine Tumormunität zu erreichen. Der Hauptnachteil von bsF(ab')₂-Fragmenten liegt darin, daß aufgrund der verwendeten Spezifitäten lediglich FcγRI+ Zellen an den Tumor redirigiert werden. T-Zellen werden durch diesen bispezifischen Antikörper nicht an den Tumor redirigiert. Die bsF(ab')₂-Fragmente besitzen zwar auch das Potential zur direkten Tumorerstörung, sind aber nicht in der Lage, selber eine Tumormunität zu etablieren. Dazu ist nur die T-Zelle mit ihrem spezifischen T-Zellrezeptor befähigt. Die FcγRI+ Zellen können zwar indirekt durch Präsentation von tumorspezifischen Peptiden (über MHC I bzw. MHCII) nach z.B. Phagozytose von Tumorzellbestandteilen tumorspezifische T-Zellen aktivieren, die Effizienz der Induktion einer Tumormunität ist hier aber nicht ganz so hoch (nur

bei 30% der Patienten).

Weitere Vorteile von intakten bsAk mit der Fähigkeit zur Redirektion von T-Zellen gegenüber den o.g. bsF(ab')₂ Fragmenten sind im einzelnen:

1. An intakte bsAk können Fc-Rezeptor positive Zellen binden und einerseits über ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) direkt zur Tumorzerstörung beitragen sowie andererseits wie oben näher ausgeführt zur T-Zellaktivierung.
2. Durch intakte T-Zell-redirigierende bsAk werden auch anergisierte tumorspezifische T-Zellen an die Tumorzelle herangeführt, die erfindungsgemäß direkt am Tumor reaktiviert werden können. Dies kann durch ein bsF(ab')₂-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziertes Antigen nicht erreicht werden.
3. Ein bsF(ab')₂-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziertes Antigen kann lediglich eine Tumorummunität in 30% der Patienten erzielen, während erfindungsgemäß in Mausversuchen mit T-Zell-redirigierenden intakten bsAk ein Schutz in 100% der Tiere erzielt werden konnte.

Die Bindung des bsAk an Fcγ-RI besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale anti-Tumorwirksamkeit:

- (1) Fcγ-RI positive Zellen besitzen die Fähigkeit mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren (11) und können insofern synergistisch zur anti-Tumorwirkung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen (13).
- (2) Fcγ-RI positive Zellen (wie z.B. Monozyten/Makrophagen/-Dendriten) sind in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle

zu verhindern. Wie in Abbildung 1 gezeigt können weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z.B. Monocyt) geliefert werden. Insofern sollte der erfindungsgemäße Antikörper neben der direkten T-Zellrezeptor-unabhängigen, durch bsAk vermittelten Tumorerstörung (Abb.1A) ebenfalls tumorspezifische T-Zellen aktivieren und generieren (Abb.1B), die nach Abbau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk kann ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z.B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden.

Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von Fcγ-RI nach G-CSF -Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird.

Die Erfindung wurde vorstehend und wird nachstehend insbesondere anhand von bispezifischen Antikörpern beschrieben. An die Stelle der bispezifischen Antikörper sind selbstverständlich aber auch trispezifische Antikörper einsetzbar, solange sie die gestellten Bedingungen erfüllen.

Die Erfindung wurde und wird anhand der beiliegenden Abbildungen näher beschrieben. Die Abbildungen zeigen:

- Abb. 1: Die Rolle akzessorischer Zellen bei der Tumor-Immuntherapie mittels bispezifischer Antikörper
- Abb. 2: Zerstörung von Tumorzellen nach Gabe von bispezifischen Antikörpern, nachgewiesen im Durchflußzytometer
- Abb. 3: Induktion von Zytokinen durch intakte bispezifische

Antikörper nur nicht aber durch parentale Antikörper

Abb. 4: Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens in vivo

Abb. 5: Trispezifische $F(ab)_2$ -Antikörper

Abb. 6: Trispezifischer scFv-Antikörper

IMMUNISIERUNGSPROTOKOLLE

Ex vivo-Immunisierung (Kurzzeitinkubation)

1. Herstellung einer Einzelzellsuspension (10^7 - 10^9 Zellen) aus autologem Tumormaterial (oder allogenen Tumorzellen desselben Tumortyps) mit anschließender γ -Bestrahlung (50-100 Gy)
2. Zugabe von bsAk (5-50 μ g) und 45 minütige Inkubation bei 4°C. Anschließend Auswaschen von ungebundenem Antikörper
3. Reinfusion des Zellgemisches (i.v.)

Ex vivo-Immunisierung (Langzeitinkubation)

1. Herstellung einer Einzelzellsuspension (10^7 - 10^9 Zellen) aus autologem Tumormaterial (oder allogenen Tumorzellen desselben Tumortyps) mit anschließender γ -Bestrahlung (50-100 Gy)
2. Zugabe von bsAk (5-50 μ g), 45 min inkubieren
3. Zugabe von PBMC (10^8 - 10^{10}), [alternativ: 1×10^9 Zellen aus T-Zellapherese]
4. nach 5 bis 7 Tagen Kontrolle der T-Zell-Reaktivität durch Transfer von Aliquots auf z.B. allogene Brustkrebszelllinien (MCF-7, MX-1)
5. Reinfusion (i.v.) der kultivierten PBMC am Tag 4 bis 14 in den Patienten (bei T-Zellapherese Kryokonservierung)

Abkürzungen: PBMC, peripheral blood mononucleated cells = mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut; i.v., intravenös.

Ein ähnlicher aber auf den Zusatz von Zytokinen angewiesener

und mit konventionellen bsAk (keine Aktivierung von akzessorischen Zellen durch bsAk der Subklassenkombination Ratte IgG2B X Ratte IgG1) durchgeführter Ansatz zeigte die prinzipielle Wirksamkeit einer derartigen ex vivo-Immunisierung im Tiermodell (5).

Im Gegensatz dazu liegt der Vorteil des hier offengelegten Verfahrens in der "Selbstversorgung" mit den für die Hochregulation von z.B. MHC 1 auf der Tumorzelle benötigten Zytokinen (wie INF- γ oder TNF- α) durch die gleichzeitige Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, Abb.) an der Tumorzelle. Dies wird durch die eingangs erwähnte besondere Subklassenkombination des hier verwendeten intakten bsAk erreicht. Bei der Kurzzeitinkubation finden diese Vorgänge im Patienten statt. Weitere Vorteile bei der Kurzzeitinkubation sind (i) Umgehung der sonst notwendigen Kultivierung der Zellsuspension mit serumhaltigen Medium. (ii) Damit entfällt auch die kostenintensive Kultivierung unter GMP-Richtlinien. (iii) Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Vermeidung bzw. Reduzierung von möglichen Nebenwirkungen durch den bsAk aufgrund der wesentlich geringeren Menge an appliziertem Antikörper.

Vorteil bei der Langzeitinkubation ist, daß der bsAk sich in vitro nach einiger Zeit selber verbraucht (und somit auch diese Methode nicht als Medikament, sondern als "medical device" etabliert werden kann).

BEISPIEL 1

Bispezifische Antikörper-vermittelte Lyse von Tumorzellen durch allogene T-Zellen

H-LAc78 ist eine Zelllinie, die aus einem Hypopharynkarzinom etabliert wurde und epcam in hohem Maße exprimiert (eigene FACS-Daten). Unter Verwendung von H-Lac78 und peripheren, mononukleären Zellen (PBMC) aus freiwilligen Spendern konnte die Generierung allogener zytotoxischer T-Lymphozyten nachweisen.

Hierzu wurden konstante Mengen H-Lac78 (2×10^4) mit unterschiedlichen Mengen PBMCs in Gegenwart (10 ng) oder Abwesenheit eines bsAk (anti-epcam X anti-CD3) inkubiert. Nach einem Zeitraum von sieben Tagen wurden die PBMCs abgenommen und im Durchflußzytometer analysiert. Gleichzeitig wurden die Zahl der H-Lac78 Tumorzellen bestimmt. Die Aktivierung der T-Zellen läßt sich mikroskopisch an der Clusterbildung beobachten, die Proliferation kann anhand des Einbaus von radioaktiven Thymidin bestätigt werden. Der Nachweis verbliebener Tumorzellen wird mikroskopisch sowie über den epithelialen Marker epcam geführt, der auf Zellen des peripheren Blutes nicht exprimiert wird. Wie in Abb. 2 gezeigt, wurden die H-Lac78-Zellen bei Anwesenheit des bsAk vollständig lysiert, d.h. im Durchflußzytometer waren nach sieben Tagen keine epcam positiven Zellen mehr nachweisbar. Diese Daten wurden durch den mikroskopischen Eindruck bestätigt. Ohne bsAk war dagegen ein vollständiger Rasen von H-Lac78-Zellen in den Wells zu sehen und im FACS waren epcam positive Zellen nachweisbar.

Nachweis aktivierter allospezifischer CTLs per Transferexperiment

In einem anschließenden Transferexperiment wurden die mit bzw. ohne bsAk inkubierten PBMCs auf neue H-Lac78-Zellen ohne erneute Zugabe von bsAk überführt. Auch hier wurden die Tumorzellen lysiert, und zwar ausschließlich von den zuvor durch den bsAk aktivierten PBMC. Die Lyse von H-Lac78 vollzog sich vollständig binnen 24 Stunden bis zu einem Verhältnis von 2 PBMC zu 1 H-Lac78-Zellen. Dieses Resultat bedeutet die Generierung allospezifischer CTLs ohne die externe Zugabe von Interleukin-2 (IL-2). Da IL-2 für die Aktivierung von T-Lymphozyten essentiell ist, sprechen die hier gemachten Daten dafür, daß durch die bsAk vermittelte Aktivierung IL-2 von den T-Zellen selbst produziert wird. Die Induktion der IL-2 mRNA bei Zugabe des bsAk konnte anschließend durch RT-PCR bestätigt werden, wobei der bsAk den parentalen Ausgangsantikörpern deutlich überlegen war

(Abb. 3). Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als IL-2 zwar als antitumoral wirksames Zytokin beschrieben wurde, eine systemische Gabe in entsprechender Konzentration wegen seiner Toxizität jedoch nur bedingt möglich ist. Die Gefahr der Toxizität ist hingegen bei der lokalen Produktion von IL-2, wie sie beispielsweise durch intakte bsAk induziert wird, nicht gegeben. Da für die effektive Induktion von IL-2 (und IL-12) eine Stimulation von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor und CD28 notwendig ist, läßt auch dies auf die Bedeutung der Fc-Rezeptor positiven Zellen (welche die Liganden für CD28: CD80 und CD86 bereitstellen) bei der Aktivierung der T-Zellen mittels intakter bsAk schließen.

BEISPIEL 2

Zur Prüfung der Frage ob bispezifische Antikörper eine langandauernde Tumormunität induzieren können, wurden C57BL/6 Mäusen zunächst 5×10^3 syngene B16 Tumorzellen injiziert. Zwei Tage später wurde eine Gruppe von Mäusen (Anzahl 18) mit intaktem, mittels Quadrom-Technologie (6) hergestelltem, bsAk behandelt, welcher eine Zielstruktur (ep-cam/C215 = tumorassoziiertes Antigen) auf der Tumorzelle sowie CD3 auf T-Zellen erkennt. Eine zweite Gruppe (Anzahl 6) erhielt lediglich eine äquimolare Menge von Fab-Fragmenten der beiden im bsAk enthaltenen Spezifitäten. Während alle Tiere der Fab-Kontrollgruppe innerhalb von 56 Tagen verstarben oder eingeschläfert werden mußten, überlebten 14 von 18 mit bsAk behandelten Tiere. 144 Tage nach der ersten Injektion von Tumorzellen wurde den überlebenden 14 Tieren erneut eine Dosis von 750 B16 Tumorzellen, diesmal ohne Gabe von bsAk, injiziert. Zur Kontrolle wurde 5 unbehandelten Tieren dieselbe Tumorzellzahl verabreicht. Während das letzte Tier der unbehandelten Kontrollgruppe 66 Tage nach Tumoringektion eingeschläfert werden mußte, überlebten alle mit bsAk behandelten Tiere (Überwachungszeitraum: 120 Tage nach zweiter Tumorzell-Injektion). Siehe auch Abbildung 4A und B: Überlebenskurven der beiden aufeinanderfolgenden, oben beschriebenen, Experimente.

L I T E R A T U R

1. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fcγ receptors with rat IgG2b, J. Immunolog., 1995, 154: 1852-1860
2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CE3 X CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer Immunol. Immunother. 40: 390, 1995
3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., and Kirkwood, J. Adoptive cellular immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract). Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PMAODO - 7589 CO, 1993.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339: 71-85, 1992
5. Guo et al., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. Nature Medicine 3: 451, 1997
6. Lindhofer et al., Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, J. Immunology 1995, 155:219

REINHARD·SKUHRA·WEISE & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. ERNST STURM (1951-1980)
DR. HORST REINHARD
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DR. STEPHAN BARTH

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN

POSTF. / P.O.BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN

* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P9435
Dr.B/Go

17. Juni 1997

Anmelder: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Neuherberg
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

**VERFAHREN ZUR EX VIVO-IMMUNISIERUNG MITTELS HETEROLOGER INTAK-
TER BISPEZIFISCHER UND/ODER TRISPEZIFISCHER ANTIKÖRPER**

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur ex vivo-Immunisierung von Mensch und Tier mit den nachfolgenden Schritten:
 - a) Isolierung autologer Tumorzellen;
 - b) Behandeln der Tumorzellen, um ihr Überleben nach Reinfusion zu verhindern;
 - c) Inkubation der so behandelten Tumorzellen mit intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern, die die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- α - Binden an eine T-Zelle;
- β - Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ - Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen;
- δ - Aktivieren die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

d) Überführen der aus c) erhaltenen, Tumorzellen enthaltenden Lösung in eine zur Reinfusion geeignete Vorrichtung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie zur Bindung Fc-Rezeptor positive Zellen befähigt sind, die einen Fc γ -Rezeptor I, II oder III aufweisen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fc γ -Rezeptor I positive Zellen befähigt sind.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort befähigt sind.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-

sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über CD2,
CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zel-
len binden.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Antikörper so ausgewählt werden, daß nach ihrer Bin-
dung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen die Expression
von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimula-
torische Antigene und/oder die Sekretion von Zytokinen
durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht
wird.

7. Antikörper nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Antikörper so ausgewählt werden, daß die Sekretion von
IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 als Zytokine und/oder
von TNF- α erhöht wird.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
der bispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er
ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder
anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-
CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X
anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-
Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tu-
mor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-
assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-as-
soziiertes Antigen-Antikörper ist.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß
der bispezifische Antikörper aus einer oder mehreren der
nachfolgenden Isotykombinationen ausgewählt wird:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,
Ratte-IgG2b/Human-IgG3 [orientaler Allotyp G3m(st) = Bin-
dung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3 [kaukasische Allotypen G3m(b+g) =
keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekenn-
zeichnet]

Maus-IgG2a/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -
Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -
Human-IgG1- [Hinge] -Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-
IgG4- [Hinge] -Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2] -Human-
IgG3* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251] -Hu-
man- IgG3* [CH3]

Ratte-IgG2b/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG2- [Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG3- [Hinge-CH2-CH3,
orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4- [Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -
Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG4 [N-terminale Region von CH2] -Human-IgG3* [C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251] -Human-IgG3* [CH3]

Human-IgG1/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG4 [N-terminale Region von CH2] -Human-IgG3* [C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251] -Human-IgG3* [CH3]

Human-IgG1/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG2 [N-terminale Region von CH2] -Human-IgG3* [C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251] -Human-IgG3* [CH3]

Human-IgG1/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG2 [N-terminale Region von CH2] -Human-IgG3* [C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251] -Human-IgG3* [CH3]

Human-IgG1/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG2/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG2- [Hinge] -Human-
IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG4/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4- [Hinge] -Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Human-IgG4/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4- [Hinge] -Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2] -Human-IgG3* [C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251] -Human-IgG3* [CH3]

Maus-IgG2b/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1- [Hinge] -Human-IgG3*- [CH2-CH3]

Maus- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4/Ratte- [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4- [Hinge] -Human-IgG4- [CH2] -Human-IgG3*- [CH3]

HumanIgG1/Ratte [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1 [Hinge] -Human-IgG4- [CH2] -HumanIgG3* [CH3]

HumanIgG1/Maus [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG1 [Hinge] -Human-IgG4- [CH2] -Human-IgG3* [CH3]

Human-IgG4/Human [VH-CH1, VL-CL] -Human-IgG4- [Hinge] -Human-IgG4- [CH2] -HumanIgG3*- [CH3]

10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
der bispezifische Antikörper aus einem heterologen Ratte/Maus bispezifischen Antikörper ausgewählt wird.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß

der trispezifische Antikörper einen T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und eine dritte Spezifität zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen besitzt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der trispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt c) nach Inkubation der Tumorzellen mit intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern die mit den Antikörpern beladenen Tumorzellen zur Reinfusion vorbereitet werden (Kurzzeitinkubation).
14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt c) die Inkubation der Tumorzellen mit den Antikörpern zusammen mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC = peripheral blood mononucleated cells) erfolgt oder nach Inkubation der Tumorzellen mit den Antikörpern die mononukleären Zellen zugegeben werden und die Inkubation fortgesetzt wird (Langzeitinkubation).
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen mit den Antikörpern für einen Zeitraum von 10 Minuten bis 5 Stunden inkubiert werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Inkubation der Tumorzellen mit den Antikörpern für
einen Zeitraum von 15 bis 120 Minuten, bevorzugt 15 bis 60
Minuten, erfolgt.
17. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, daß die mononukleären Zellen aus
dem peripheren Blut zusammen mit den Tumorzellen und den
Antikörpern für einen Zeitraum von 1 bis 14 Tagen, bevor-
zugt 3 bis 10 Tagen und weiterhin bevorzugt 6 bis 10 Tagen
inkubiert werden.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut in einer
Menge von ca. 10^8 bis 10^{10} Zellen zugegeben werden.
19. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Tumorzellen in einer Menge von 10^7 bis 10^9 Zellen, be-
vorzugt ca. 10^8 Zellen, zugegeben werden.
20. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper in
einer Menge von 2 bis 100 μg , bevorzugter 5 bis 70 μg ,
insbesondere bevorzugt 5 bis 50 μg zugegeben werden.
21. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Behandlung der Tumorzellen im Schritt b durch Bestrah-

lung, bevorzugt durch γ -Bestrahlung, weiterhin bevorzugt in einer Dosisstärke von 50 bis 100 Gy, oder durch chemische Substanzen, bevorzugt Mitomycin C, erfolgt.

22. Verwendung eines Verfahrens nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen.
23. Verwendung nach Anspruch 21 zur Induktion einer Tumorummunität.
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von mit heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern behandelten autologen Tumorzellen zur Reinfusion in den Patienten oder das Tier, aus dem die autologen Tumorzellen entnommen wurden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur ex vivo-Immunisierung von Mensch und Tier mit den nachfolgenden Schritten beschrieben:

- a) Isolierung autologer Tumorzellen;
- b) Behandeln der Tumorzellen, um ihr Überleben nach Reinfusion zu verhindern;
- c) Inkubation der so behandelten Tumorzellen mit intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern, die die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:
 - α - Binden an eine T-Zelle;
 - β - Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
 - γ - Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen;
 - δ - Aktivieren die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.
- d) Überführen der aus c) erhaltenen, Tumorzellen enthaltenden Lösung in eine zur Reinfusion geeignete Vorrichtung.

Abb.1:
Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie
mittels bispezifischer Antikörper

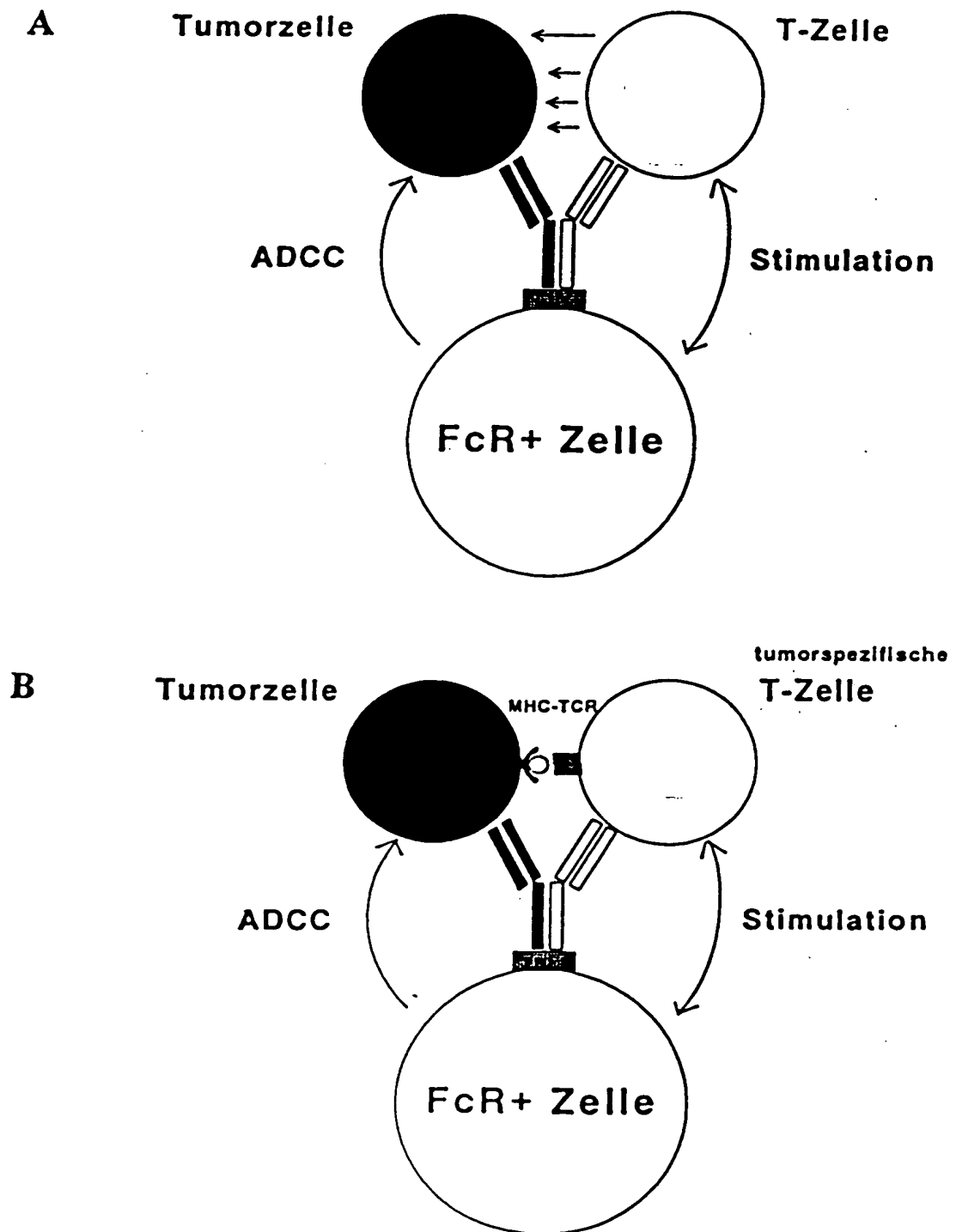
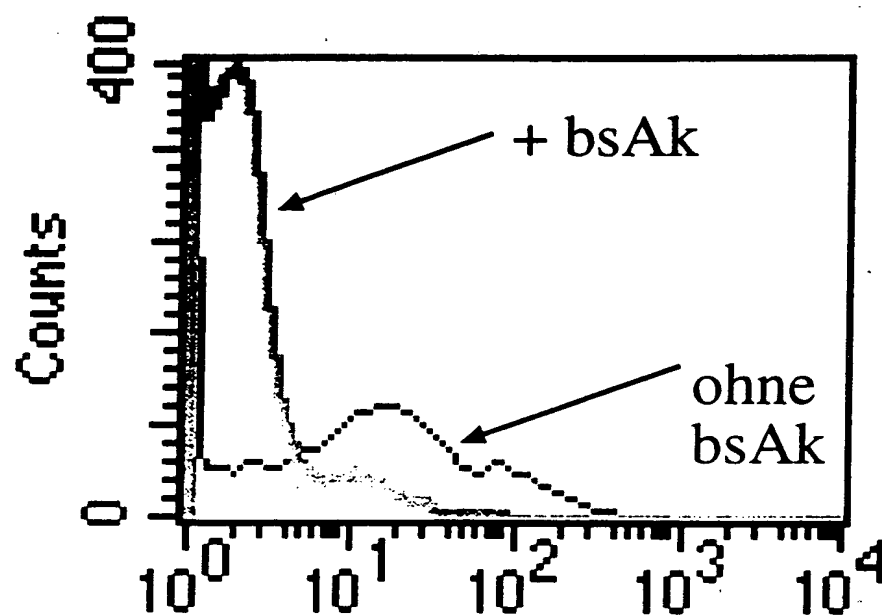


Abbildung 2



BEST AVAILABLE COPY

Abbildung 3

Induktion von Zytokinen durch
intakte bsAk, nicht aber durch
parentale AK

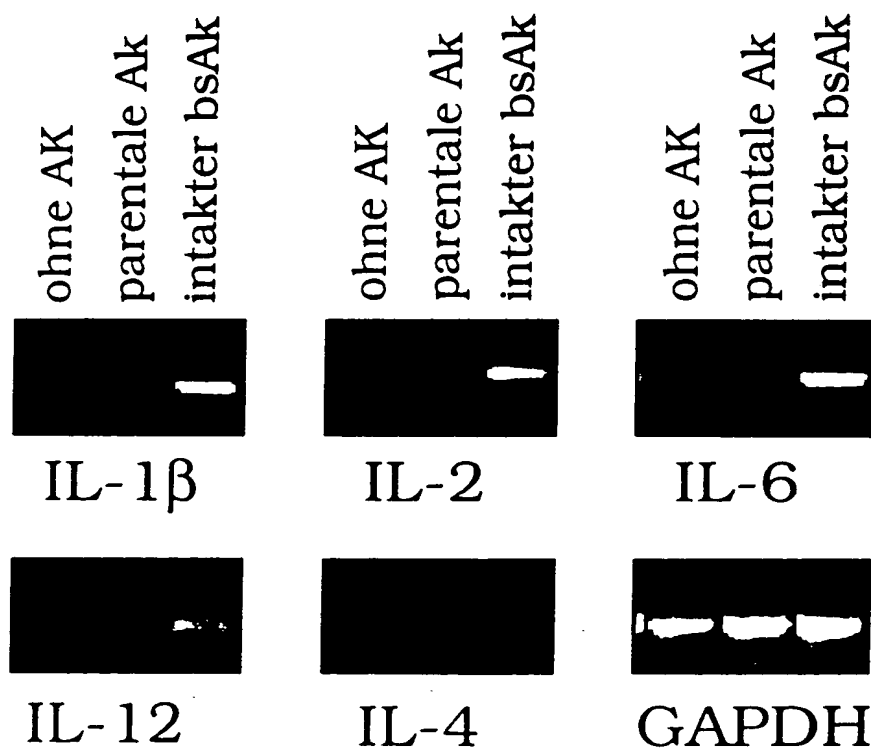
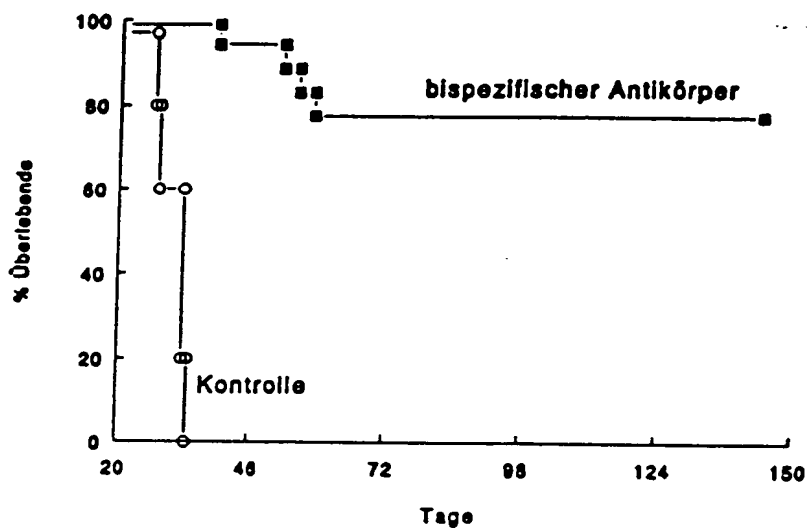


Abbildung 4

Wirksamkeit *in vivo*

A Überleben nach Injektion von 5×10^3 B16 Melanomzellen und bispez. Antikörpern



B Erneute Tumordinjektion am Tag 144

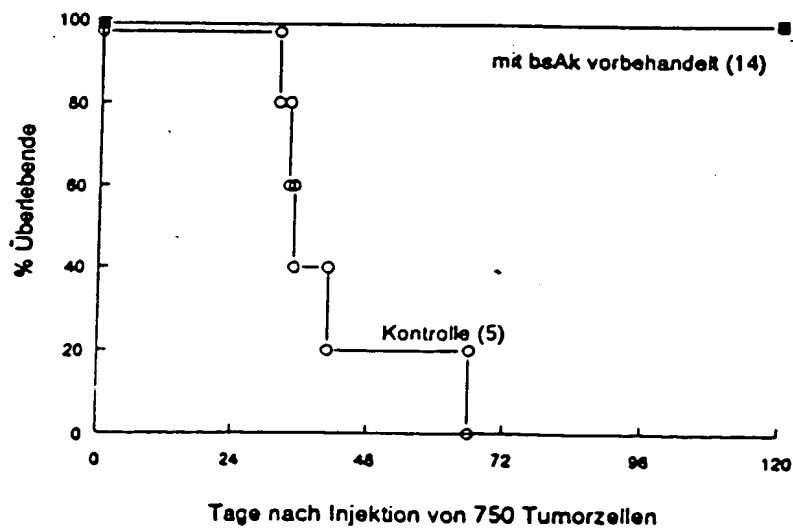


ABBILDUNG 5

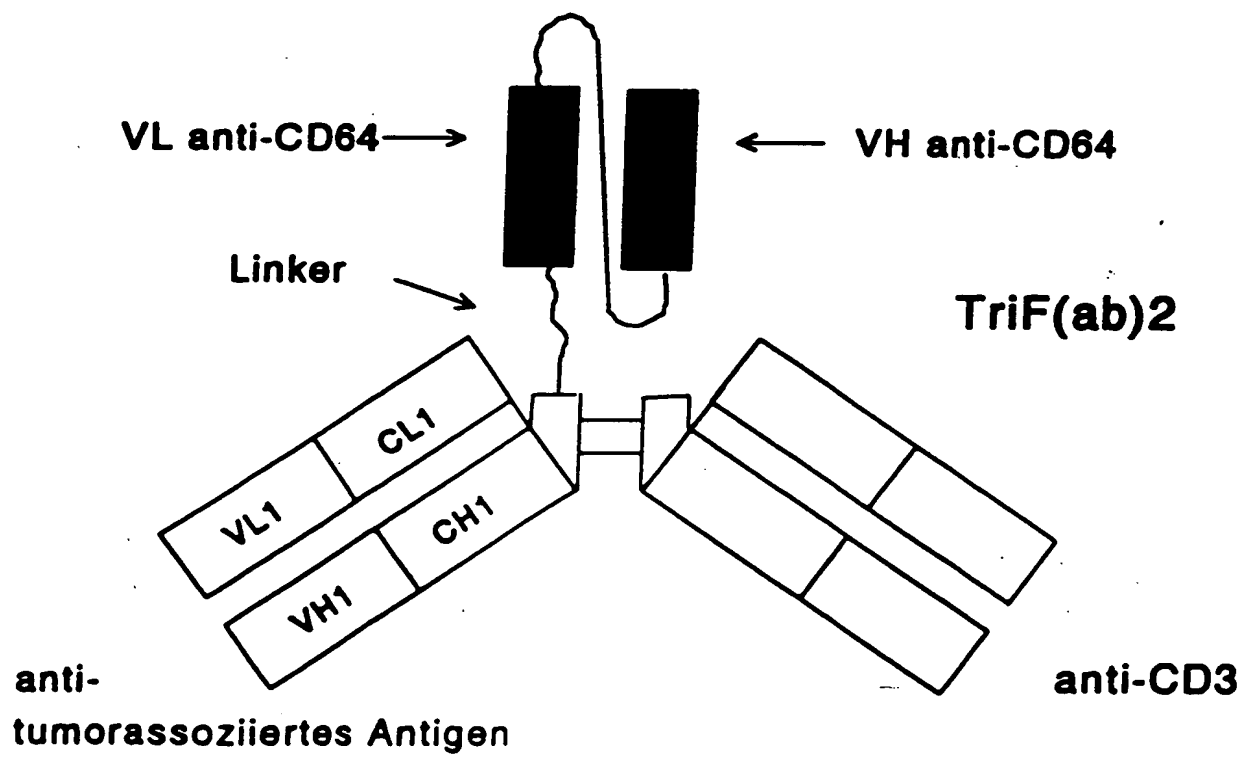
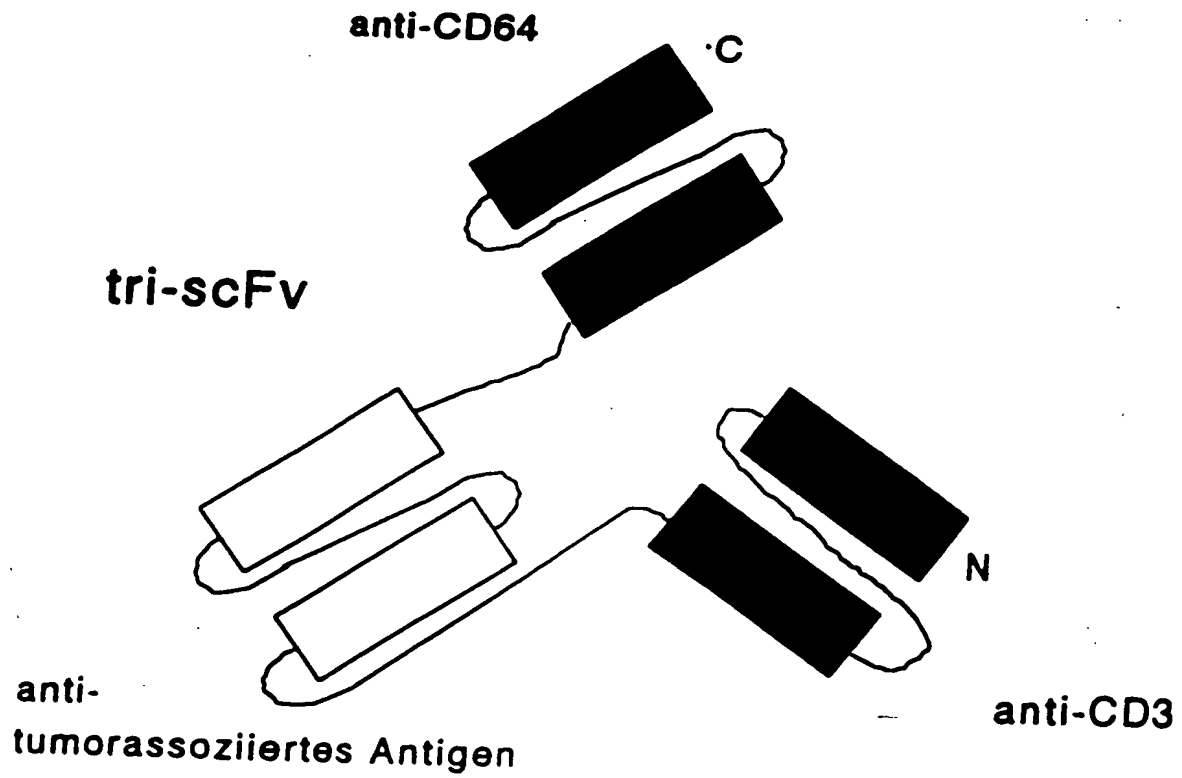


ABBILDUNG 6



BEST AVAILABLE COPY